

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 771 105

②① N° d'enregistrement national : 97 14751

⑤① Int Cl<sup>6</sup> : C 12 P 33/06 // (C 12 P 33/06, C 12 R 1:77)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 20.11.97.

③⑦ Priorité :

⑦① Demandeur(s) : VITASTEROL SOCIETE A RESPON-  
SABILITE LIMITEE — FR.

⑦② Inventeur(s) : DRAY FERNAND JOSEPH et  
COTILLON ANNE CECILE.

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 21.05.99 Bulletin 99/20.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤④ UTILISATION DU FUSARIUM MONOLIFORME POUR LA PREPARATION DES DERIVES 7ALPHA-  
HYDROXYLES DE LA DEHYDROEPIANDROSTERONE ET DE LA PREGNENOLONE.

⑤⑦ La présente invention concerne un procédé pour la  
préparation de la 7 $\alpha$ -hydroxy-déhydroépiandrostérone et de  
la 7 $\alpha$ -hydroxy-pregnénolone à partir de la déhydroépi-  
androstérone et de la pregnénolone, respectivement, qui com-  
prend essentiellement une étape de bioconversion utilisant  
le Fusarium moniliforme.

FR 2 771 105 - A1



USSN 10/5409,370 PC37949A

UTILISATION DU *FUSARIUM MONILIFORME* POUR  
LA PRÉPARATION DES DÉRIVÉS 7 $\alpha$ -HYDROXYLÉS DE  
LA DÉHYDROÉPIANDROSTÉRONNE ET DE LA PREGNENOLONE

5 La présente invention est relative à la  
préparation de dérivés 7 $\alpha$ -hydroxylés de la  
déhydroépiandrostérone (DHEA) et de la pregnénolone (PREG),  
en utilisant, à la place des réactions chimiques classiques,  
un processus de bioconversion mettant en oeuvre le *Fusarium*  
10 *moniliforme* comme agent clé catalysant l'hydroxylation en  
position 7 $\alpha$  des stéroïdes DHEA ou PREG donnés comme  
substrats.

La nécessité de production de stéroïdes 7 $\alpha$ -  
hydroxylés est soulignée dans certains brevets d'application  
15 où la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA est produite par voie chimique et est  
revendiquée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (WO  
94/03176), l'augmentation de la réponse immunitaire (WO  
93/20696; WO 94/03176; WO 94/08588; WO 96/35428), des effets  
antiglucocorticoïdes (WO 94/08588), le traitement de  
20 l'obésité (WO 92/03925), du diabète et de certains cancers  
(US 4,898,694).

Dans ces brevets, la plupart des revendications  
s'étendent à d'autres stéroïdes 7 $\alpha$ -hydroxylés, dont la 7 $\alpha$ -  
hydroxy-PREG (US 5,175,154; WO 94/08588; WO 96/35428). Dans  
25 tous les cas, l'obtention des stéroïdes 7 $\alpha$ -hydroxylés  
procède de processus chimiques au cours desquels plusieurs  
étapes permettent d'hydroxyler en positions 7 $\alpha$  et 7 $\beta$  la DHEA  
ou la PREG. Les stéroïdes 7 $\alpha$ -hydroxylés sont ainsi produits  
avec des rendements qui n'excèdent pas 40% après des étapes  
30 de purifications nécessaires et coûteuses.

Il est donc apparu souhaitable d'utiliser un  
processus de bioconversion permettant de faire réaliser par  
un microorganisme la transformation directe d'un stéroïde  
comme la DHEA exclusivement en son dérivé 7 $\alpha$ -hydroxylé.

35 L'hydroxylation de stéroïdes en diverses  
positions est décrite depuis longtemps dans "Microbial

*transformations of steroids*" (A. CAPEK et coll., Biologia et Industria, Ed. W. Roman & L. Genevois, 1966 Praha, Publ. Dr. W. Junk, La Hague, Pays-Bas). Depuis, quelques travaux ont mentionné l'obtention de dérivés 7 $\alpha$ -hydroxylés de la DHEA

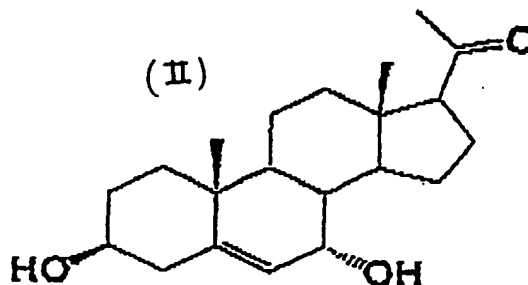
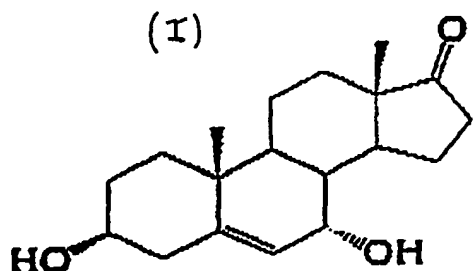
5 avec des rendements de 21,5% pour *Gibberella saubinetti* (Okada et coll., *Yakugaku Zasshi*, 1965, 85:816-822), de 30% pour *Diaporthe celastrina* (Bell et coll., *J.C.S. Perkin I*, 1975, 1364-1366), de 35% avec *Fusarium graminearum* (Defaye et coll., *J. Steroid Biochem.*, 1978, 9:331-336) et de 22,5%  
10 avec *Mucor pyriformis* (Madyastha & Joseph, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, 44:339-343). Ces derniers obtenaient avec *Mucor pyriformis* 25% de rendement pour la transformation de la PREG en 7 $\alpha$ -hydroxy-PREG.

15 Dans l'ensemble de ces travaux, les objectifs poursuivis ne concernaient pas une production exclusive de dérivés

7 $\alpha$ -hydroxylés, et dans d'autres publications, les souches utilisées pour la 7 $\alpha$ -hydroxylation s'appliquaient à des stéroïdes différents, comme la progestérone, la testostérone  
20 ou leurs dérivés saturés.

La Demanderesse a maintenant trouvé que, de façon surprenante, la DHEA et la PREG pouvaient être hydroxylées en position 7 $\alpha$  avec des rendements nettement supérieurs en utilisant *Fusarium moniliforme*. En particulier, l'activité  
25 7 $\alpha$ -hydroxylante de cette souche s'est révélée hautement inductible par la DHEA, et la souche induite transforme plus de 90% de la DHEA en son dérivé 7 $\alpha$ -hydroxylé.

Les stéroïdes produits selon l'invention, à savoir la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA et la 7 $\alpha$ -hydroxy-PREG sont  
30 caractérisés respectivement par les formules suivantes:



5

10

15

20

25

30

35

Le *Fusarium moniliforme* utilisé pour la production de ces stéroïdes fait partie des ascomycètes et possède donc, à l'état parfait, des asques triseptiques qui le désignent dans le genre *Gibberella*. L'identification spécifique du *Fusarium moniliforme* pourrait s'avérer difficile car plusieurs nomenclatures sont utilisées fréquemment. D'une part, Wollenweber et Reinking (*Die Fusarium*, 1935, Paul Parey, Berlin), le désignent dans le groupe *Liseola* (3<sup>e</sup> groupe du genre *Gibberella*), et d'autre part, Snyder et Haussen (*Amer. J. Bot.*, 1940, 27:64-67) identifient l'espèce en tant que *Fusarium moniliforme*. Enfin, le *Fusarium moniliforme* amorphe est quelquefois désigné d'après son genre sous le nom de *Gibberella fujikuroi*.

La souche de *Fusarium moniliforme* décrite et utilisée dans les essais présentés plus loin a été isolée et identifiée par le groupe de microbiologie de l'Ecole Supérieure de Microbiologie et de Sécurité Alimentaire de Brest (Technopole Brest-Iroise, 29280 Plouzané) où elle est conservée en mycothèque.

Pour une croissance optimale, les cultures de *Fusarium moniliforme* sont réalisées en mode aérobie sur milieu stérile composé de glucose (10g/litre), poudre d'extrait de boeuf (10g/litre) et extrait de levure (5g/litre). Le pH du milieu est ajusté à 5,5 et la température est maintenue à 27°C. Dans ces conditions, et 48 heures après l'insémination, la masse de mycélium de *Fusarium moniliforme* obtenue est de 4 grammes/litre environ. Toutefois, toute modification de la composition du milieu ou

des conditions d'incubation ou du rendement en poids de mycélium obtenu font partie de la présente invention.

Les conditions nécessaires pour que le mycélium de *Fusarium moniliforme* obtenu puisse assurer la bioconversion de la DHEA ou de la PREG en leurs dérivés 7 $\alpha$ -hydroxylés décrits ci-dessus sont exposées ci-après.

Le mycélium de *Fusarium moniliforme* produit est récupéré par filtration ou tout autre mode permettant de le séparer de son milieu de culture. Il est ensuite introduit dans un milieu neuf et identique en composition à celui mentionné plus haut, mais contenant de la DHEA 0,3 mM, cette DHEA étant ajoutée au milieu sous forme de solution dans un solvant organique hydrosoluble, de préférence l'éthanol, en quantité n'excédant pas 0,5 pour cent du volume du milieu. La phase d'induction de l'activité 7 $\alpha$ -hydroxylante du mycélium débute alors avec l'incubation à 27°C en phase aérobie (de 30 à 90 ml d'air par minute et par litre de milieu).

L'étude de l'induction du mycélium de *Fusarium moniliforme* par la DHEA démontre que ce stéroïde est rapidement absorbé du milieu vers le mycélium d'où il est excrété ensuite principalement sous la forme de 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA (I). Ainsi, au bout de 18 heures d'incubation, 80 pour cent des stéroïdes extraits du milieu sont de la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA (Figure 1). Par ailleurs, la recherche de l'activité 7 $\alpha$ -hydroxylante induite par la DHEA est localisée principalement dans la fraction microsomale (Figure 2).

Dans les microsomes de *Fusarium moniliforme* induit par la DHEA, cette activité enzymatique est due à un cytochrome P450 particulier, comme l'ont démontré l'inhibition de l'activité 7 $\alpha$ -hydroxylante par le monoxyde de carbone, les spectres de différence à 450 nm et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes où une protéine microsomale de 56 kDaltons apparaît au cours du processus d'induction. Dans les microsomes de *Fusarium moniliforme* induit, la 7 $\alpha$ -

hydroxylation de la DHEA s'effectue avec un  $K_m$  de  $1,2 \cdot 10^{-6}$  M et une vitesse maximale de 0,9 nmoles par minute et par mg de protéines microsomales.

Le mycelium induit est à nouveau récupéré comme ci-dessus, et introduit dans un nouveau milieu minimal stérile (10 g de mycélium induit par litre), dont la composition peut varier sans affecter la présente invention, mais contenant, de préférence, 1 g par litre de glucose et 9 g par litre de chlorure de sodium à pH 5,5. Ce milieu contient aussi 400 mg par litre de DHEA ou de PREG, ajoutés sous forme de solution dans un solvant organique miscible à l'eau, de préférence l'éthanol, en quantité n'excédant pas 3 pour cent du volume du milieu.

Au bout de 24 heures d'incubation aérobie (30 à 90 ml d'air par minute et par litre de milieu), et afin de récupérer les stéroïdes produits de la bioconversion, le milieu d'incubation est soumis à tout procédé d'extraction applicable dans le cadre de la présente invention. L'extraction peut être effectuée avec un solvant organique non miscible à l'eau, de préférence l'acétate d'éthyle.

Ainsi, l'application de cette méthode permet, en une seule étape, et grâce au *Fusarium moniliforme* induit par la DHEA, de transformer plus de 80 pour cent de la DHEA ou de la PREG en leurs dérivés 7 $\alpha$ -hydroxylés I ou II, respectivement. Cette transformation est due à un cytochrome P450 microsomal spécifiquement induit par la DHEA, et dont l'isolement, la reconstitution, l'immobilisation sur supports artificiels ou l'utilisation par quelque technique que ce soit, font partie de la présente invention.

L'invention concerne notamment la production des stéroïdes I et II par bioconversion en une seule étape au moyen de *Fusarium moniliforme*.

Elle concerne également l'utilisation de la déhydroépiandrosterone (DHEA) comme inducteur de l'enzyme effectuant la 7 $\alpha$ -hydroxylation de la déhydroépiandrosterone

et de la pregnénolone dans les microsomes de *Fusarium moniliforme*.

Elle concerne en outre l'utilisation sous forme native dans le mycelium ou sous forme différemment élaborée des microsomes du *Fusarium moniliforme* induits par la DHEA pour les productions des composés I et II.

Elle concerne aussi l'induction des enzymes microsomales à l'aide de toute molécule organique apte à effectuer cette induction, de préférence la DHEA.

Les stéroïdes I ou II élaborés sont avantageusement extraits directement du milieu de culture par tout solvant organique et tout processus se prêtant à cette extraction.

Dans les conditions décrites, ces stéroïdes sont obtenus à partir de DHEA ou de pregnénolone (PREG), respectivement avec des taux supérieurs à 60 pour cent de bioconversion.

L'isolement et la purification de I ou de II après extraction est effectuée par toute méthode adéquate pour la séparation et la purification de ces stéroïdes.

La production des stéroïdes I et II utilise avantageusement la chromatographie séquentielle ou continue à l'échelle industrielle, ou la cristallisation différentielle dans des solvants miscibles de polarités opposées.

L'invention concerne encore l'utilisation des stéroïdes I ou II produits selon l'invention pour l'application topique dans les domaines cosmétique et dermatopharmaceutique.

Elle concerne de plus l'utilisation des milieux de bioconversion contenant les stéroïdes I ou II obtenus selon l'invention dans les domaines cosmétique et dermatopharmaceutique pour les applications anti-âge, hydratante, séborégulatrice, amincissante, raffermissante, pour la protection contre les rayons UV et pour le traitement des cheveux ou du cuir chevelu.

Dans les dessins annexés :

La Figure 1 montre les stéroïdes totaux et la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA produite, mesurés dans le milieu et le mycélium de *Fusarium moniliforme* au cours de l'induction de l'activité 7 $\alpha$ -hydroxylante par la DHEA 0,3 mM.

La Figure 2 montre l'activité enzymatique mesurée dans les fractions subcellulaires isolées à partir du mycélium de *Fusarium moniliforme* au cours du processus d'induction de l'activité 7 $\alpha$ -hydroxylante par la DHEA 0,3 mM.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer et mieux expliquer l'invention.

Exemple I:

**Production de 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA (I)**

Un gramme de mycélium de *Fusarium moniliforme* induit pendant 18 heures par la DHEA est récupéré et introduit dans 100 ml de milieu à pH 5,5 contenant 1 g par litre de glucose, 9 g par litre de chlorure de sodium et 40 mg de DHEA ajoutés en solution dans 2 ml d'éthanol. Afin de quantifier la DHEA et ses produits de transformation, on introduit également 1 200 000 dpm de [4-<sup>14</sup>C]-DHEA (3  $\mu$ g dans 10  $\mu$ l d'éthanol).

Après incubation aérobie (5 ml d'air par minute) pendant 24 heures, le milieu est récupéré par filtration, rincé par 100 ml d'eau distillée, puis le filtrat obtenu est extrait par 3 fois 50 ml d'acétate d'éthyle. Cet extrait contient 1 100 000 dpm de la radioactivité initiale, soit 91,6 pour cent (36,7 mg) de la DHEA introduite initialement.

L'extrait concentré est soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice (30 g) montée dans l'acétate d'éthyle et éluée par l'acétate d'éthyle. Trois fractions principales sont successivement obtenues, la première correspondant à la DHEA (9,1 pour cent, 3,3 mg), la deuxième correspondant à la 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA (1,3 pour cent, 0,5 mg), et la troisième correspondant à la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA (86 pour cent, 31,6 mg).



Dans ces conditions, le rendement de production de la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA récupérée à partir du milieu est donc de 79 pour cent.

Un échantillon de 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA (I) authentique, produit par synthèse chimique, et dont les caractéristiques physico-chimiques sont celles établies dans les travaux précédents (Dodson et coll., *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, 81:6295-6297; Defaye et coll., *J. Steroid Biochem.*, 1978, 9:331-336) sert de référence pour l'identification de la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA produite par le *Fusarium moniliforme* dans les conditions décrites ci-dessus.

Un échantillon de 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA (I) authentique et une portion des 31,6 mg de la fraction chromatographique correspondant à la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA, sont transformés en dérivés di-triméthylsilyl éthers (réaction avec le bis-silyl-trifluoroacétamide à 60°C pendant 40 minutes). Une fraction des des dérivés obtenus est ensuite soumise à la chromatographie en phase gazeuse (colonne capillaire avec phase stationnaire HP-1), couplée à la spectrométrie de masse utilisée en ionisation positive par bombardement d'électrons. Dans les conditions de l'expérience, le temps de rétention sur la colonne chromatographique du dérivé di-triméthylsilyl éther de la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA authentique est de 13,8 minutes, et le spectre de masse indique un fragment majoritaire à  $m/z$  358 ( $M+90$ ) et des fragments minoritaires à  $m/z$  343,  $m/z$  129 et  $m/z$  73. Le même temps de rétention et un même spectre de masse sont obtenus avec le dérivé di-triméthylsilyl éther du produit récupéré après cette production.

Cette identification permet de conclure que le *Fusarium moniliforme* induit par la DHEA transforme bien la DHEA en 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA (I). Dans les conditions décrites, le taux de cette transformation est voisin de 80 pour cent.

#### Exemple II:

#### **Production de 7 $\alpha$ -hydroxy-PREG (II)**

Un gramme de mycélium de *Fusarium moniliforme* induit pendant 18 heures par la DHEA est récupéré et introduit dans 100 ml de milieu à pH 5,5 contenant 1g par litre de glucose, 9 g par litre de chlorure de sodium et 40 mg de PREG ajoutés en solution dans 2 ml d'éthanol. Afin de quantifier la PREG et ses produits de transformation, on introduit également 1 200 000 dpm de [20-<sup>14</sup>C]-DHEA (3,1 µg dans 10 µl d'éthanol).

Après incubation aérobie (5 ml d'air par minute) pendant 24 heures, le milieu est récupéré par filtration, rincé par 100 ml d'eau distillée, puis le filtrat obtenu est extrait

par 3 fois 50 ml d'acétate d'éthyle. Cet extrait contient 1 050 000 dpm de la radioactivité initiale, soit 87,5 pour cent (35 mg) de la PREG introduite initialement. L'extrait concentré est soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice (30 g) montée dans l'acétate d'éthyle et éluée par l'acétate d'éthyle. Deux fractions principales sont successivement obtenues, la première correspondant à la PREG (12 pour cent, 4,2 mg), la deuxième correspondant à la 7α-hydroxy-PREG (74 pour cent, 25,9 mg). Les 14 pour cent restants (4,9 mg) sont constitués de plusieurs produits minoritaires non identifiés.

Dans ces conditions, le rendement de production de la 7α-hydroxy-PREG récupérée à partir du milieu est donc de 65 pour cent.

Un échantillon de 7α-hydroxy-PREG (II) authentique, produit par synthèse chimique, (Akwa et coll., *Biochem. J.*, 1992, 288: 959-964) sert de référence pour l'identification de la 7α-hydroxy-PREG produite par le *Fusarium moniliforme* dans les conditions décrites ci-dessus.

Un échantillon de 7α-hydroxy-PREG (II) authentique et une portion des 25,9 mg de la fraction chromatographique correspondant à la 7α-hydroxy-PREG, sont transformés en dérivés di-triméthylsilyl éthers (réaction avec le bis-silyl-trifluoroacétamide à 60°C pendant 40

minutes). Une fraction des dérivés obtenus est ensuite soumise à la chromatographie en phase gazeuse (colonne capillaire avec phase stationnaire HP-1), couplée à la spectrométrie de masse utilisée en ionisation positive par bombardement d'électrons. Dans les conditions de l'expérience, le temps de rétention sur la colonne chromatographique du dérivé di-triméthylsilyl éther de la 7 $\alpha$ -hydroxy-PREG authentique est de 17,75 minutes, et le spectre de masse indique un fragment majoritaire à  $m/z$  386 et des fragments minoritaires à  $m/z$  296,  $m/z$  207,  $m/z$  143,  $m/z$  129 et  $m/z$  73. Le même temps de rétention et un même spectre de masse sont obtenus avec le dérivé di-triméthylsilyl éther du produit récupéré après cette production.

Cette identification permet de conclure que le *Fusarium moniliforme* induit par la DHEA transforme bien la PREG en 7 $\alpha$ -hydroxy-PREG (II). Dans les conditions décrites, le taux de cette transformation est voisin de 65 pour cent.

**REVENDICATION**

1. Procédé pour la préparation de la 7 $\alpha$ -hydroxy-déhydroépiandrostérone et de la 7 $\alpha$ -hydroxy-pregnénolone à partir de la déhydroépiandrostérone et de la pregnénolone, respectivement, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement une étape de bioconversion utilisant le *Fusarium moniliforme*.

. 5

10

